



9º Congresso de Pesquisa

**EFEITO DA ESTIMULAÇÃO ELÉTRICA DE ALTA VOLTAGEM EM DIFERENTES
PARÂMETROS NA LESÃO TEGUMENTAR EM RATOS: ANÁLISE HISTOPATOLÓGICA.**

Autor(es)

MARIA LUIZA OZORES POLACOW

Co-Autor(es)

ELAINE CALDEIRA DE OLIVEIRA GUIRRO

1. Introdução

Quando o tegumento sofre perda de solução de continuidade, desencadeia-se uma série de processos biológicos e histoquímicos, que trazem como consequência uma ação vasomotora, com a finalidade de mobilizar, de maneira rápida, as diferentes células encarregadas do combate à infecção, da limpeza da ferida e sua reparação (FAZIO, ZITELLI e GOSLEN, 2000).

A incorporação da corrente de alta voltagem como instrumento terapêutico para cicatrização de feridas, tem obtido resultados satisfatórios em lesões com diferentes etiologias (DAVINI, et. al., 2005), embora ainda apresente pouca comprovação experimental, o que gera de um lado, incertezas quanto às suas reais ações e de outro, atribuições não pertinentes a essa forma de estimulação.

Pesquisa clínica realizada por Silva (2009) constatou que a EEAV é um método eficiente para promover a cicatrização e reduzir a intensidade da dor de úlceras crônicas de indivíduos de ambos os gêneros, quando comparado com o tratamento convencional (limpeza, curativo oclusivo e medicamentos).

Existem inúmeros trabalhos na literatura com aplicação da EEAV em úlceras cutâneas crônicas, porém, em lesões agudas em modelo animal, que possibilitam estudos histológicos, os trabalhos são escassos.

Com base nas informações apontadas configura-se a hipótese de que a EEAV possa abreviar o processo de regeneração tecidual mediada por diferentes parâmetros físicos.

2. Objetivos

Estudar os efeitos da estimulação elétrica de alta voltagem (EEAV) com diferentes parâmetros físicos (corrente catódica, anódica e alternada) sobre as características morfométricas da regeneração tegumentar em ratos.

3. Desenvolvimento

Este estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa com Animais da Universidade Federal de São Carlos protocolo: 002/2010.

Trinta e cinco ratos (Wistar) com idade entre 3 a 4 meses distribuídos aleatoriamente em 5 grupos (n=7) e tratados por 7 dias: Controle (C) - animais com lesão e sem tratamento. SHAM (S)- com lesão, tratadas com EEAV placebo. (E+) - com lesão tratadas com EEAV pólo positivo, (E-) com lesão tratadas com EEAV pólo negativo e (E ±) - com lesão tratadas com EEAV pólos alternados. Todos os animais foram pesados, e anestesiados via intramuscular com Dopalen® (Cloridrato de Cetamina) 1,16 g/10 mL e Rompun® (Cloridrato de Xilazina) 2 g/100 mL, na proporção 3:2, em dose de 0,09 mL/100 g e 0,06 mL/100 g de massa corporal, respectivamente. Em seguida os animais foram tricotomizados na região dorsal, onde foi removido 1 cm² de pele utilizando um gabarito vazado milimetrado.

O tratamento dos animais teve início 24 horas após, com o equipamento Neurodyn High Volt-ANVISA Q0360310008 – IBRAMED, na frequência de 100 Hz e tensão mínima de 100 V, no limiar motor, durante 30 minutos por 7 dias.

O eletrodo ativo de silicone-carbono, medindo 2,0 x 2,0 cm, foi posicionado sobre a lesão cirúrgica e outro, dispersivo, medindo 4,0 x 4,0 cm posicionado na região abdominal, preservando-se sempre esta distância entre eles. Os eletrodos dispersivos foram acoplados com gel estéril, e os eletrodos ativos, com gaze embebida de soro fisiológico. O grupo SHAM também foi anestesiado e preparado para receber a eletro estimulação, porém o equipamento não foi ativado.

Foram realizados registros fotográficos logo após o procedimento cirúrgico, no 3º dia de tratamento e no 7º dia de tratamento, com uma máquina fotográfica SONY-CYBERSHOT 8.1 posicionada perpendicularmente à ferida, acoplada a um tripé, sempre numa distância de 40 cm do animal, incluindo uma régua na imagem. A área das lesões foi calculada utilizando-se o Software Mateus Poli – versão 2.0.

Após a eutanásia dos animais no 8º dia pós-operatório, as lesões foram removidas e submetidas ao processamento histológico para coloração por Hematoxilina-Eosina.

As medidas lineares (em μ m) da re-epitelização foram obtidas a partir do bordo da lesão até a extremidade do epitélio em regeneração em ambos os bordos com uma ocular milimetrada da Zeiss.

Para as análises histométricas, foram utilizadas 3 áreas em cinco cortes, totalizando 15 imagens por animal, onde foram obtidos os números de fibroblastos, fibrócitos e leucócitos, bem como a densidade de área de vasos sanguíneos, utilizando-se o Software Image-Pro Plus® 6.0 (Media Cybernetics).

Para a comparação entre grupos, aplicou-se a ANOVA F. As variáveis fibroblastos e fibrócitos foram analisadas pelo teste de Tamhane para a comparação de variâncias desiguais. Já leucócitos, vasos sanguíneos, epitelização e área da lesão foram analisados pelo teste de Post Hoc Tukey, considerando-se $p < 0,05$.

4. Resultado e Discussão

Pelos resultados apresentados observa-se que a redução média da área da lesão do grupo C (65%) e do grupo S (59%) foi semelhante. Já a porcentagem média da redução da área de lesão dos grupos E- (76%), E+ (75%) e E± (75%) embora maiores que os dos grupos C (65%) e S (59%), não foram significativamente diferentes, como pode ser observado na Figura 1.

Trabalhos utilizando diferentes modelos animal tem mostrado resultados controversos em relação a estimulação elétrica de alta voltagem, bem como nos seus vários parâmetros.

Brown e Gogia (1987) com estimulação pólo negativo em lesão tegumentar de coelhas durante duas horas, duas vezes ao dia, por quatro ou sete dias, com tensão entre 30 a 60 V, não encontraram diferenças significativas, embora com resultados melhores comparados com o grupo controle. Tais dados foram confirmados no presente trabalho.

A aplicação de diferentes polaridades pode interferir na resposta tecidual, uma vez que as diversas células presentes na cicatrização podem migrar em função da carga, fato apontado por Kloth e McCulloch, (1996). Observaram uma atração de neutrófilos e macrófagos pelo pólo negativo ocorrendo então uma autólise para solubilizar a necrose; todavia, o eletrodo positivo facilita a migração das células epidérmicas, que são carregadas negativamente.

De acordo com a Tabela 1 não houve diferença significativa no número das células nos diferentes grupos experimentais, com exceção dos fibroblastos do grupo tratado por EEAV pólo E-. A análise estatística mostrou aumento significativo de 20,46% em relação ao grupo controle ($p < 0,02$).

O aumento do número de fibroblastos nas lesões tratadas com E -, aponta para uma situação que propicia uma melhor cicatrização, confirmando outros trabalhos da literatura.

Neste sentido, uma ampla revisão realizada por Kloth (2005) apresenta os efeitos da corrente elétrica exógena em cultura de células in vitro. Estudo como o de Bourguignon e Bourguignon, (1987) observou mudanças na síntese e metabolismo celular, como aumento na taxa de síntese protéica e de DNA em fibroblastos estimulados com corrente pulsada de alta voltagem. Já outros estudos relatam efeitos migratórios das células atraídas pela polaridade oposta do eletrodo processo conhecido como quimiotaxia ou galvanotaxia (Orida e Feldman, 1982; Sheridan, Isserof e Nuccitelli, 1996).

A contração da ferida é outro fator essencial para o processo de reparo, que tem como causa a presença de miofibroblastos.

Como, neste trabalho, o número de fibroblastos nas lesões tratadas por E- foi maior, pode-se inferir que, se o tratamento continuasse por mais tempo, talvez outros resultados como o da epitelização por exemplo, poderia ser diferente, considerando a possibilidade de haver maior contração da ferida. Como pode ser observado na Tabela 2, os resultados da epitelização neste trabalho, não foram

diferentes nos vários grupos experimentais.

Mohr, Akers e Wessman (1987), relatam que a EEAV também aumentou significativamente o fluxo sanguíneo de ratos estimulados durante três minutos.

Neste estudo, no entanto, os animais estimulados não apresentaram aumento na densidade de área dos vasos, o que pode ser justificado pelo tempo para o retorno ao fluxo sanguíneo normal, que, segundo Mohr, Akers e Wessman (1987), foi em média de 5 a 14 minutos (dependendo da frequência utilizada) após o término da estimulação. Os animais utilizados neste experimento foram sacrificados 24 h após a última sessão o que impossibilitou a análise dos efeitos imediatos provocados no local.

A maioria dos trabalhos que apontam reação ao recurso, aplicou-o em úlceras crônicas que podem ter diferentes origens, porém sua principal etiologia está associada a uma disfunção vascular (Frade et al., 2005). No presente estudo foi utilizado como modelo experimental uma ferida de segunda intenção, aguda e abrangeu a fase inflamatória e proliferativa, onde se observou grande número de células e vasos sanguíneos – tecido de granulação, e sem infecção.

Os resultados aqui apresentados reforçam a necessidade de se estudar histologicamente este recurso em modelos experimentais cujas lesões tenham um déficit circulatório, como no diabetes, por exemplo, e em diferentes dias para se abordar todas as fases de um processo de reparação.

5. Considerações Finais

Pode-se concluir que a EEAV utilizada com polaridades isoladas e alternada não alterou a reparação de feridas agudas nas variáveis: área da ferida, epitelização e vascularização.

No entanto, com pólo negativo provocou aumento do número de fibroblastos, célula importante na cicatrização e demonstra que o recurso pode ser interessante para acelerar a regeneração de feridas. Futuros trabalhos podem explorar melhor estas variáveis, utilizando outros modelos experimentais, maior número de animais e em intervalos de tempo diferentes.

Referências Bibliográficas

BOURGUIGNON, G.J.; BOURGUIGNON, L.Y. Electric stimulation of protein and DNA Syntheses in human fibroblast. *FASEB. J.*, v.1: 398, 1987.

BROWN, M.; GOGIA, P.P. Effects of high voltage stimulation on cutaneous wound healing in rabbits. *Phys Ther.*, v.67,n.5: p.662-667,1987.

DAVINI, R.; NUNES, C.V.; GUIRRO, E.C.O.; GUIRRO, R.R.J. Tratamento de úlceras cutâneas crônicas por meio da estimulação elétrica de alta voltagem. *Rev Ciênc Méd PUCCAMP.* v.14, n.3, p.249-258, 2005.

FAZIO, M.J.; ZITELLI, J.A.; GOSLEN, J.B.. Cicatrização de feridas. In: COLEMAN, W.P.; HANKE, C.W.; ALT, T.H; ASKEN, S.; *Cirurgia Cosmética – Princípios e Técnicas.* Rio de Janeiro, Ed. Revinter, 2000, p. 18-38

FRADE, M. A. C.; CURSI, I. B.; ANDRADE, F. F.; SOARES, S. C.; RIBEIRO, W. S.; SANTOS, S. V.; FOSS, N. T. Úlcera de perna: um estudo de casos em Juiz de Fora – MG (Brasil) e região. *An. bras. dermatol.* v.80, n.1, p. 41-46, 2005.

KLOTH, L. C. Electrical stimulation for wound healing: a review of evidence from in vitro studies, animal experiments, and clinical trials. *Lower Extremity Wounds*, v. 4, n. 1, p. 22-43, 2005.

KLOTH, L.C.; McCULLOCH J.M. Promotion of wound healing with electrical stimulation. *Activ Wound Care.* V.9, n.5, p.42-45, 1996.

MOHR, T.; AKERS, T. K.; WESSMAN, H. C. Effect of high voltage stimulation on blood flow in the rat hind limb. *Physical Therapy*, v. 67, n. 4, p. 526-533, 1987.

SILVA, E. F. H.; *Estimulação Elétrica de Alta Voltagem em Úlceras Crônicas de Membros Inferiores.* 2009. 86 p. Dissertação (Mestrado em Fisioterapia) Faculdade de Ciências da Saúde, Universidade Metodista de Piracicaba, Piracicaba, 2009.

SHERIDAN, D.; ISSEROFF, R.;NUCCITELLI, R. Imposition of a physiologic

DC electric field alters the migratory response of human keratinocytes on extracellular matrix molecules. *J Invest Dermatol.* v.106, n.4, p.642-646, 1996

ORIDA, N.; FELDMAN, J.D. Directional protrusive pseudopodial activity and motility in macrophages induced by extracellular electric fields. *Cell Motil.* v.2, n.243-52,1982.

Anexos

Tabela 2 – Média + Desvio Padrão (em μm) da extensão da epiderme sobre a superfície da ferida dos grupos: C: controle, S: sham, E+: tratado com EEAV pólo +, E-: tratado com EEAV pólo -, E: tratado com EEAV pólos alternados.

Grupos	Reepitelização
C	1541,25 + 1021,28
S	1504,05 + 1436,76
E+	1347,77 + 506,81
E-	1437,70 + 923,98
E±	3068,76 ± 1666,92

Tabela 1 – Média \pm Desvio Padrão do número de fibroblastos, fibrócitos e leucócitos dos grupos: C: controle, S: sham, E+: tratado com EEAV pólo +, E-: tratado com EEAV pólo -. E±: tratado com EEAV pólos alternados.

	Fibroblasto	Fibrócito	Leucócito
Grupos			
C	83,80 \pm 10,06	0,55 \pm 0,31	6,08 \pm 3
S	90,84 \pm 23,60	0,57 \pm 0,43	6,34 \pm 2,61
E+	106,11 \pm 5,47	0,74 \pm 0,31	7,79 \pm 0,66
E-	110,95 \pm 16,05*	0,46 \pm 0,25	6,96 \pm 3,30
E±	78,05 \pm 10,89	0,10 \pm 0,08	14,12 \pm 3,06

*Diferente do C ($p < 0,02$).

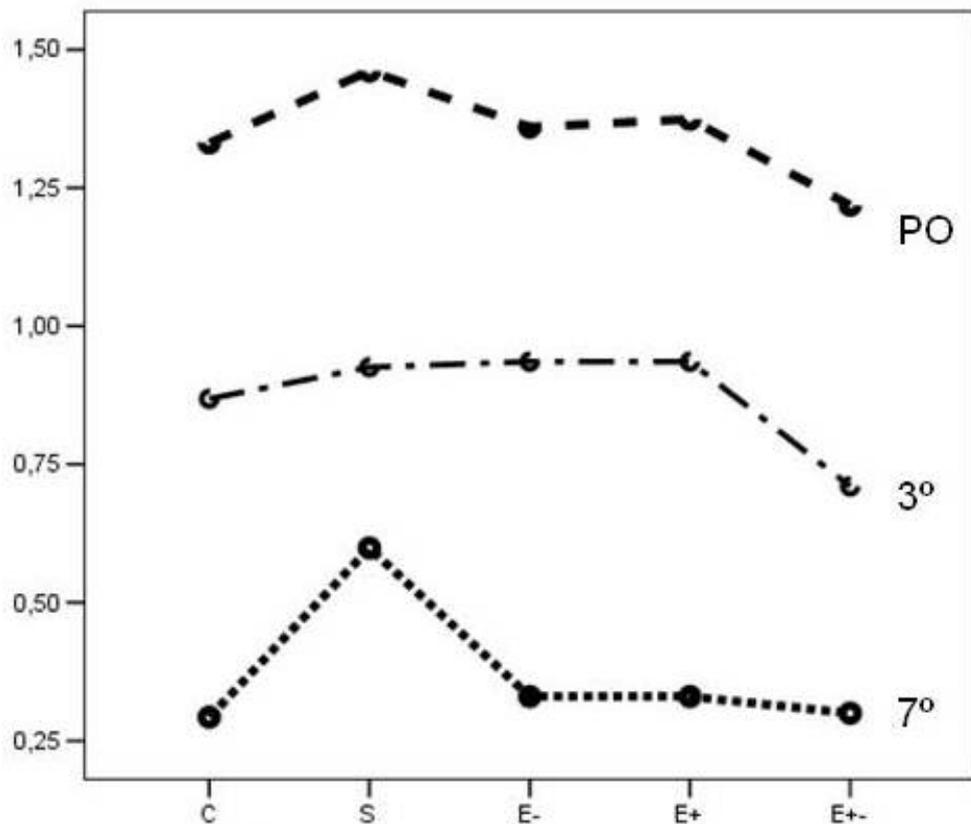


Figura 1 - Área da lesão em cm² em três períodos: pós operatório, no 3º dia de tratamento e no 7º dia de tratamento. C(control), S (Shan), E-(EEAV polo-), E+ (EEAV polo+) e E±(EEAV polos alternados).